

Kübra SARAÇOĞLU¹
Semih ERKAN²

Fasulye Tohumlarındaki Viral Etmenlerin Saptanmasında Tanı Yöntemlerinin Duyarlılıklarının İncelenmesi *

The Studies on Sensitivity of The Detection Methods of Viral Agents in Bean Seed Samples

¹ Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü,
06105 Bakanlıklar Ankara / Türkiye
² Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma
Bölümü, 35100 İzmir / Türkiye
sorumlu yazar: kbr_syr@hotmail.com

* Bu araştırma ilk yazarın yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır.

Alınış (Received): 22.03.2016

Kabul tarihi (Accepted): 02.05.2016

Anahtar Sözcükler:

Fasulye, tohum, viral enfeksiyonlar,
tanılama yöntemleri

Key Words:

Bean, seeds, viral infections, detection
methods

ÖZET

Bu çalışma, 2012 ve 2013 yıllarında değişik tohum firmalarından ve Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nden temin edilen 70 adet farklı fasulye tohum örneğinde virüslerin bulunma durumunun ve bu virüslerin tanılanmasında kullanılan yöntemlerin duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Fasulye tohum örneklerindeki viral etmenlerin tanılanmasında simptomatoloji, bitki yetiştirme, biyolojik testleme (mekanik inokulasyon), seroloji ve moleküler yöntemler kullanılmıştır. Tohum örneklerinde 5 viral etmenin varlığı RT-PCR, 4 virüsün tanılanması ise DAS-ELISA yöntemi ile incelenmiş ve bu yöntemlerin diğer yöntemlerle duyarlılık durumu kıyaslanmıştır. Çalışmadaki toplam 70 tohum örneğinin RT-PCR yöntemi ile 69'u, DAS-ELISA yöntemi ile 62'si, mekanik inokulasyon ile 30'ü, tohumdaki belirtilerin görsel olarak incelenmesi ile 48'i ve bitki yetiştirme testleri ile 70 tohum örneğinden gelişme gösteren 64 bitkiden 48'i enfektelidir. Tohum örneklerinde BCMV, BCMNV, CMV ve SMV adlı viral etmenlerinin olduğu bulunurken, AMV'ne rastlanılmamıştır. Elde edilen sonuçlara göre, tanılama yöntemleri arasında RT-PCR' in en duyarlı yöntem olduğu ve tohum örneklerinin büyük bir kısmının BCMV ile enfekteli bulunduğu görülmüştür.

ABSTRACT

The study was conducted to find out the presence of viral infections in 70 bean seed samples providing from different seed companies and Ege University Faculty of Agriculture Department of Horticulture. In order to determine the sensitivity of the methods used in the detection of viral infections in bean seed samples, the studies carried out in 2012 and 2013 years. To detect the viral infections in bean seed samples; symptomatology, growing-on test, biological test (mechanical inoculation), serological and molecular methods were used. The presence of 5 viral agents in bean seed samples was checked by RT-PCR, while the diagnosis of other 4 viruses was done with DAS-ELISA. Considering the results obtained, the sensitivity of the methods used in this work was investigated for the detection of viruses in bean seed samples. Out of 70 bean seed samples, the infection of certain viruses was detected in 69 samples by RT-PCR, 62 by DAS-ELISA, 48 by viral examinations and 30 by biological indexing. In growing-on assays, the viral infections were found in 48 of 64 plants developing from 70 seed samples. BCMV, BCMNV, CMV, and SMV were detected in seed samples, while AMV was not found. According to the findings from this study, it was found that RT-PCR was the most sensitive methods in the detection of the viruses in bean seed samples and the majority of bean seed samples was infected with BCMV.

GİRİŞ

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) yaklaşık 700 cins ve 18 000 tür içeren baklagiller (*Fabaceae*) familyası içinde yer alan önemli bir üründür. Fasulyenin günümüzden yaklaşık 7 000 yıl önce Orta Amerika'da kültüre alınmasıyla başlayan tarihi, sıcak bölgelerden subtropikal ve ılıman bölgelere doğru yayılmasıyla devam etmiştir (Balkaya and Yanmaz, 1999).

Besin değeri bakımından birçok üstünlüğe sahip fasulye bitkisi yüksek protein, düşük yağ, vitaminler, mineral maddeler ve diyetel lifler içermesi nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedirler (USAID, 2012). Baklagillerin insan beslenmesinin yanı sıra hayvan beslenmesinde, ilaç endüstrisinde, mobilya ve kağıt yapımında, boya ve reçine yapımı ve kozmetik sanayi gibi birçok alanda da kullanıldığı görülmektedir. Ayrıca, baklagiller simbiyotik azot fiksasyonu yapabilen tek bitki grubu olduklarından, toprak verimliliğinin artırılmasında kullanılmaktadır (Önder, 2011).

İnsanlığın en önemli gıda kaynakları arasında yer alan baklagiller içinde fasulye üretimi ve ürün kalitesi viral, bakteriyel ve fungal kökenli birçok etmen tarafından olumsuz yönde etkilenmektedir. Fasulye üretiminde hastalıkların sebep olduğu ürün kaybı yaklaşık %10 civarındadır (Hall, 1991). Bu yüzdellik kısım içerisinde viral etmenlerin payı büyüktür.

Türkiye'de ve dünyada önceki yıllarda yapılan araştırmalarda belirlenen ve fasulye bitkilerinde enfeksiyona neden olan viral hastalık etmenleri arasında *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Bean common mosaic virus* (BCMV), *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV), *Bean curly dwarf virus* (BCDV), *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Bean leaf roll virus* (BLRV), *Bean mild mosaic virus* (BMMV), *Bean pod mottle virus* (BPMV), *Bean rugose mosaic virus* (BRMV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Broad bean mottle virus* (BBMV), *Broad bean necrosis virus* (BBNV), *Broad bean stain virus* (BBSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV), *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), *Pea early browning virus* (PEBV), *Soybean chlorotic mottle virus* (SbCMV), *Soybean mosaic virus* (SMV), *Tobacco streak virus* (TSV), *Tomato black ring virus* (TBRV) ve *Tomato ring spot virus* (ToRSV) bulunmaktadır (DPV, 2012). Fasulye tohumlarında enfeksiyona neden olan virüslerin belirlenmesi ve bunların tanılanmasında yararlanılan değişik yöntemlerin incelendiği çalışmaların sayısı hayli fazladır. Fajardo (1930) tarafından önerilen simptomatoloji yöntemi ilk kez BCMV için fasulye tohum örneklerinde uygulanmıştır. Daha sonraki yıllarda, diğer virüsler için bu çalışmalara yenileri eklenmiştir. Bariana et al. (1994), AMV için DAS-ELISA ve PCR testini kullanmış ve bunların duyarlılıklarını

saptamıştır. Spence and Walkey (1995), BCMV için sadece DAS-ELISA yöntemini kullanırken, Sengooba et al. (1997) ise BCMNV için mekanik inokulasyon ve serolojik yöntemleri aynı anda uygulamıştır. Saqib et al. (2000) ve Flores et al. (2003), BCMV ve BCMNV'nün ırk tespitini PCR yöntemi ile yapmışlardır. Peyambari et al. (2006), tohum örneklerinde BCMV'nün bulunma durumunu ELISA ve PCR yöntemini kullanarak araştırmışlar ve bu yöntemleri duyarlılık açısından kıyaslamışlardır. 2002-2003 yılları arasında Samsun ilinde yapılan bir çalışmada, 53 adet fasulye tohum örneğinin % 18.9'unun BCMV, % 17'sinin BCMNV ve % 17'sinin CMV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Güzel ve Arlı-Sökmen, 2003). Bu araştırma, ülkemizde BCMNV'nün BCMV enfeksiyonundan ayırmasını sağlayan ilk çalışma özelliğindedir.

Bu çalışmada 70 farklı fasulye tohum örneği BCMV, BCMNV, SMV, AMV ve CMV adlı virüslerin varlığı için test edilmiştir. Analizlerde tanı yöntemlerinden simptomatoloji, biyolojik test (mekanik inokulasyon), serolojik (DAS-ELISA) ve moleküler (RT-PCR) yöntemler kullanılmış ve bu yöntemlerin duyarlılıklarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Simptomatoloji

Çalışmada kullanılan değişik tohum firmaları ve EÜZF Bahçe Bitkileri Bölümünden alınan 70 tohum örneği tohum renginde ve şeklinde değişme, tohum büyüklüğünde azalma, tohum kabuğunda buruşma, beneklenme, leke, çizgi, bant, nekroz vb. simptomların varlığı yönünden görsel olarak incelenmiştir.

Bitki Yetiştirme Testleri

Bu testler için tohum ekimi yapılmadan önce bazı ön hazırlıklar yapılmıştır. Kullanılacak toprak karışımı ve saksılar dezenfekte edilmiş ve tohumlar ilaçlanmıştır. 2 tekerrürlü olmak üzere 4'er tohum ekilmiş olan saksılar, çimlenme için uygun olduğu bildirilen 20-22°C'lik sıcaklığa sahip olan iklim odasında muhafaza edilmiştir (ISTA, 2012). Gözlemler kotiledon yapraklı evre, çiçeklenme ve bakla oluşum dönemlerinde yapılmış ve bulgular kayıt altına alınmıştır.

Biyolojik Testler

Daha önce yapılan çalışmalara paralel olarak belirlenen test bitkileri (*Chenopodium amaranticolor* Coste and Reyn., *Chenopodium quinoa* L., *Cucumis sativus* L., *Gomphrena globosa* L., *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun, *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi, *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L., *Vicia faba* L. ve *Vigna unguiculata* L.) uygun gelişme dönemlerine ulaştıkları zaman tohumdan elde

edilen özsü ile mekanik olarak inokule edilmiştir (Noordam, 1973; Nogay, 1983; Matthews, 1991).

Serolojik Test Yöntemi (DAS-ELISA)

Çalışmada yumuşatılarak ezilen fasulye tohumlarına DAS-ELISA testi, araştırmacı ve firmaların önerilerine göre uygulanmıştır (Clark and Adams, 1977; Erkan ve ark., 1995). Sonuçlar ELISA Reader cihazı kullanılarak spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir.

Moleküler Yöntemler (RT-PCR)

Viral etmenler için RT-PCR yöntemi kullanılmış ve bu amaçla ıslatılarak yumuşatılmış tohum örneklerinde TNA ekstraksiyonu (Foissac *et al.*, 2001) yapılmış ve cDNA sentez kitleri kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi RT-PCR testlerinde kullanılan primerler, baz uzunlukları ve kullanılan sıcaklık döngüleri için (De Blas *et al.*, 1994; Samuitienė and Navalinskienė 2008; Hart, 2004; Martinez *et al.*, 2004; Cadle-Davidson and Jahn, 2005; Larsen *et al.*, 2005)'de verilen bilgilerden yararlanılmıştır. Ethidium bromide ile boyanan agaroz jel, Jel Dokümantasyon ve Analiz Sistemi ile fotoğrafı çekilerek kayıt edilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Tohum örneklerinde gözlenen belirtiler

Araştırmadaki 70 fasulye tohum örneğinin semptomatolojik açıdan görsel olarak incelenmesi sonucunda, 48 örnekte tohum renginde değişme, sararma, tohum büyüklüğünde küçülme, buruşma, hilum renginde değişme, şekil bozuklukları ve beneklenme olduğu görülmüştür. Ayrıca, bazı örneklerde tohumlarda kaplama hataları ve mekanik zararların da mevcut olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 1).

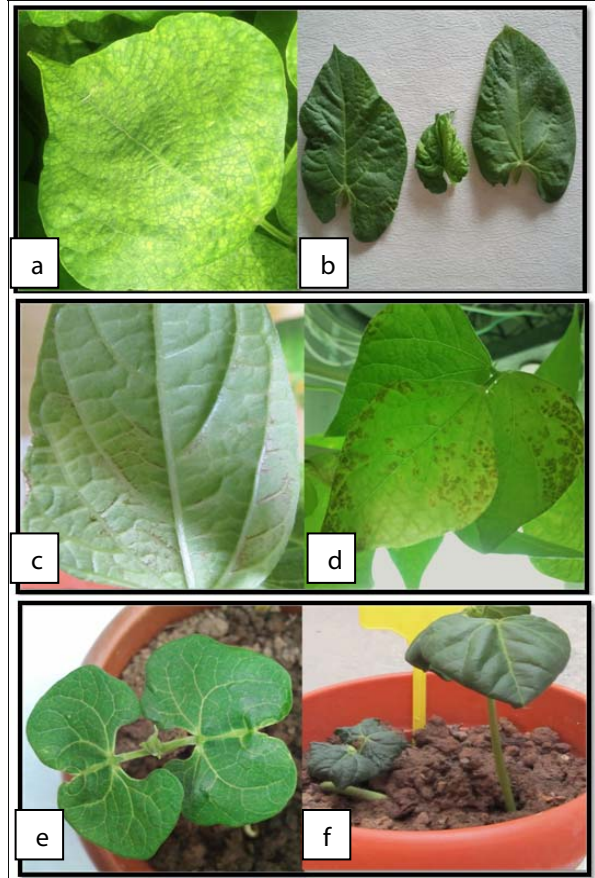


Şekil 1. Fasulye tohumlarında gözlemlenen belirtilere ait bir görünüm: (a) renk değişiklikleri ve beneklenme, (b, d) şekil bozuklukları, (c) mekanik zarar ve yanıklık

Figure 1. Symptoms observed on bean seeds: (a) colour variations and mottling, (b, d) malformations, (c) mechanical damages and burns

Bitkilerde gözlenen belirtiler

Araştırma kapsamında 70 fasulye tohumunun yetiştirilmesi sonucu 6 bitkide çıkış görülmez iken yetişenler arasındaki 48 bitki de yaprak kıvrılması, yaprak kabarcıklaşması, şekil bozukluğu, mozaik, gelişim geriliği, damar arası sararma, yaprakta açık veya koyu yeşil renkli alanlar, klorotik damar bantlaşması, kloroz, nekrotik lekeler ve ölüm gibi belirtilerin bulunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 2).



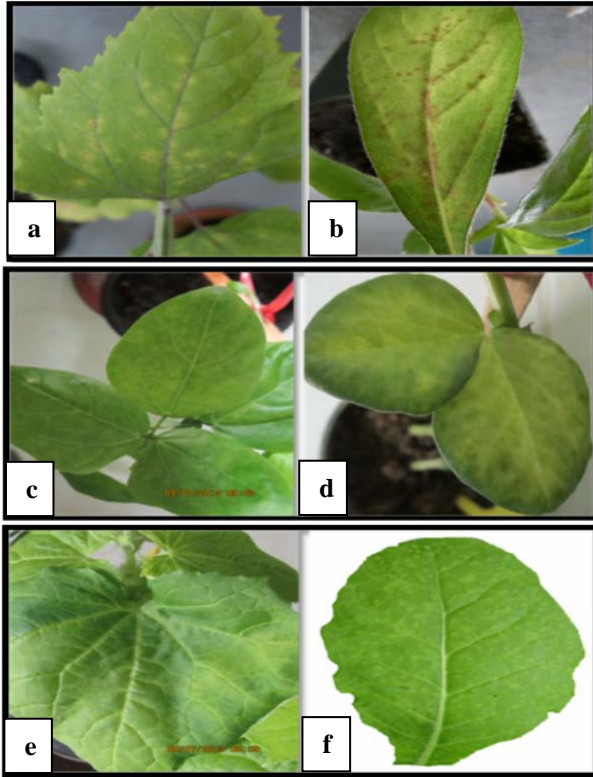
Şekil 2. Fasulye tohumlarından yetişen bitkilerde görülen bazı belirtilere ait görünüm : (a) mozaik, (b) yaprakta kabarcıklaşma, (c) damar nekrozu, (d) nekrotik leke, (e) şekil bozukluğu, (f) gelişme geriliği

Figure 2. Some symptoms in plants grown from bean seeds: (a) mosaic, (b) leaf blistering, (c) veinal necrosis, (d) necrotic spots, (e) deformation, (f) retardation in growth

Biyolojik testlerin (Mekanik inokulasyon) sonuçları

Yapılan değerlendirme sonucunda, tohum örneklerinden 30'unun bazı test bitkilerinin yapraklarında klorotik lokal lezyonlar, mozaik, renk açılmaları, deformasyonlar ve nekrotik lekeler gösterdiği belirlenmiş ve teyit etmek amacıyla belirli

gösteren yapraklara DAS-ELISA uygulanmıştır (Şekil 3). Test bitkilerinde ortaya çıkan belirtiler, 30 tohum örneğinde BCMV'nün, 12 tohum örneğinde ise bu virüsün CMV ve SMV ile birlikte bulunduğunu göstermektedir.



Şekil 3. Fasulye tohum örneklerindeki virüsleri değişik test bitkilerinde ortaya koyduğu belirtilere ait görünüm: (a) *C. quinoa* - klorotik/nekrotik lokal leke, (b) *G. globosa* - kırmızı lokal leke, (c-d) *V. unguiculata* ve *V. faba* - mozaik, (e) *C. sativus* - mozaik, (f) *N. tabacum* - klorotik lokal leke).

Figure 3. Symptoms induced by viruses in bean seed samples on different test plants: (a) *C. quinoa* - chlorotic/necrotic local spot, (b) *G. globosa* - reddish local spot, (c, d) *V. unguiculata* and *V. faba* - mosaic, (e) *C. sativus* - mosaic, (f) *N. tabacum* - chlorotic local spot).

Serolojik testlerin sonuçları

Çalışmada kullanılan 70 tohum örneğinde BCMV, CMV, SMV ve AMV adlı etmenlerin varlığını belirlemek için serolojik yöntemlerden DAS-ELISA testi uygulanmıştır. Testler sonucunda; 62 tohum örneğinde virüs enfeksiyonunun varlığı saptanmıştır (Çizelge 1).

Moleküler testlerin sonuçları

Çalışmada kullanılan 70 adet tohum örneği ile yapılan RT-PCR' in sonuçları, sadece 1 örnekte virüs enfeksiyonunun bulunmadığını göstermiştir (Çizelge 2). Moleküler testlere ait bazı jel fotoğrafları Şekil 4 ve Şekil 5'te verilmiştir.

Çizelge 1. Fasulye tohum örneklerinde DAS-ELISA yöntemi ile saptanan virüsler ve bu virüslerin bulunma oranları.

Table 1. Viruses detected with DAS-ELISA in bean seed samples and their existence ratios

Virüs Adı	Enfekteli tohum örneği sayısı	Bulunma oranı (%)
BCMV	44 (12*)	62.86
BCMNV**	--	--
CMV	5 (9*)	7,14
SMV	0 (7*)	0
BCMV+CMV	6	8.57
BCMV+SMV	4	5.71
CMV+SMV	1	1.43
BCMV+CMV+SMV	2	2.86
Toplam Enfekteli Tohum Örneği Sayısı	62	88.57
Toplam Sağlıklı Tohum Örneği Sayısı	8	11.43
Toplam Testlenen Tohum Örneği Sayısı	70	100

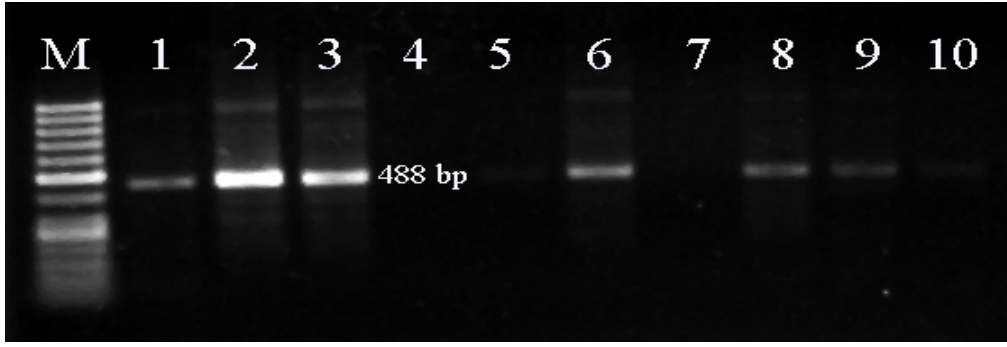
* Karışık enfeksiyon durumunda bulunan viral etmeni göstermektedir. (It shows viral agent determined in mixed infections) ** BCMNV DAS-ELISA yöntemi ile test edilmemiştir. (DAS-ELISA was not applied for BCMNV)

Çizelge 2. Fasulye tohum örneklerinde RT-PCR yöntemi ile saptanan virüsler ve bu virüslerin oranları

Table 2. Viruses detected by RT-PCR in bean seed samples and their existence ratios

Virüs	Enfekteli tohum örneği sayısı	Bulunma oranı (%)
BCMV	43 (26*)	61.43
BCMNV	0 (7*)	0
CMV	0 (15*)	0
SMV	0 (7*)	0
AMV	0	0
BCMV+BCMNV	7	10
BCMV+CMV	12	17.14
BCMV+SMV	4	5.71
BCMV+CMV+SMV	3	4.29
Toplam Enfekteli Tohum Örneği Sayısı	69	98.57
Toplam Sağlıklı Tohum Örneği Sayısı	1	1.43
Toplam Testlenen Tohum Örneği Sayısı	70	100

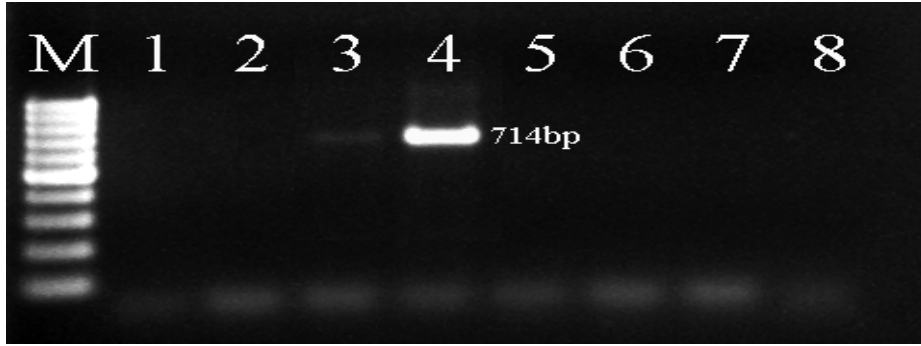
* Karışık enfeksiyon durumunda bulunan viral etmeni göstermektedir. (It shows viral agent determined in mixed infections)



Şekil 4. Fasulye tohum örneklerinde BCMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüsü görünümü [M: 100bp DNA ladder; 1,2,3,6,8: BCMV ile enfekteli tohum örnekleri, 9: Pozitif kontrol; 10: Negatif kontrol]

Figure 4. Gel electrophoresis results of BCMV on bean seed samples by RT-PCR

[M: 100bp DNA ladder; 2,3,6,8: seed samples infected with BCMV, 9: Positive control; 10: Negative control]



Şekil 5. Fasulye tohum örneklerinde BCMNV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüsü [M: 100bp DNA ladder; 4: BCMNV ile enfekteli tohum örneği, 7: Pozitif kontrol; 8: Negatif kontrol]

Figure 5. Gel electrophoresis results of BCMNV on bean seed samples by RT-PCR

[M: 100bp DNA ladder; 4: seed sample infected with BCMNV, 7: Positive control; 8: Negative control]

Tanılama yöntemlerinin duyarlılık durumunun karşılaştırılması

Tohum örneklerine yapılan test sonuçlarının karşılaştırmalarında tanılama yöntemleri arasında RT-PCR yönteminin, denemelerde tüm yöntemlerle belirlenen pozitif örneklerin tamamını saptayarak tanılamada %100 oranında bir başarı sağladığı

görülmüştür. Bu yöntemin sonuçları baz alındığında, DAS-ELISA yönteminin % 89.85, test bitkilerine inokulasyon yönteminin % 60.00, simptomatolojinin % 69.56 ve bitki yetiştirme yönteminin % 69.30 oranlarında başarılı olduğu belirlenmiştir. Virüsleri tanılamada kullanılan yöntemlerin detaylı karşılaştırılmalı sonuçları Çizelge 3' de verilmektedir.

Çizelge 3. Enfekteli fasulye tohum örneklerinde farklı tanılama yöntemlerine göre virüslerin belirlenme durumu

Table 3. Determination status of viruses in infected bean seed samples according to different detection methods

Virüs	Enfekteli Fasulye Tohum Örneği Sayısı		
	RT-PCR	DAS-ELISA	Mekanik İnokulasyon
BCMV	69	56	30
BCMVN *	7	--	--
CMV	15	14	8
SMV	7	7	4
AMV	0	0	0

* BCMNV DAS-ELISA ve mekanik inokulasyon yöntemi ile test edilmemiştir. (DAS-ELISA and biological test were not applied for BCMNV)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Araştırma kapsamında fasulye tohumlarındaki ekonomik öneme sahip 5 önemli viral etmenin simptomatolojik, biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler ile tanınması ve kullanılan bu tanılama yöntemleri arasındaki duyarlılığın saptanması amaçlanmıştır.

Simptomatoloji yöntemi kapsamında tohumların görsel olarak incelenmesi ve tohumdan bitki yetiştirme testlerinin sonucunda yapılan gözlemlerde bazı tohumlarda belirti yokken, yetiştirilen bitkide belirtilerin olduğu, bunun tersine tohumda belirtilerin olmasına rağmen bu tohumdan yetişen bitkide belirtinin olmadığı durumlarla karşılaşılmıştır. İki yöntemden birinde belirti gösteren ve tohumda, bitkide belirti göstermeyen örneklerin RT-PCR testi ile test edilmesi sonucu virüsün varlığı saptanmıştır. Daha önce simptomatoloji yönteminin kullanıldığı çalışmalarda (Zaumeyer and Goth, 1964; Zaumeyer and Thomas, 1975), BCMV ile enfekteli bitkilerin daha küçük tohum oluşturması, enfekteli tohum zarflarının küçük, koyu yeşil renkte olması nedenleriyle enfekteli tohumların gözle ayırt edebilmesinin mümkün olduğu belirtilmiştir. Provvidenti et al., (1982) BCMV ve SMV ile enfekteli bitkileri tarla koşulları altında ayırmanın zor olduğunu ve simptomatoloji yönteminin tek başına kullanılmadığını belirtirken, Agarwal ve Sinclair (1988) ise bitki yetiştirme yöntemi ile meydana gelen tohumlardaki değişik renkteki beneklenmenin SMV virüsü ile ilişkili olduğunu bildirmiştir.

Mekanik inokulasyon sonucunda belirti oluşturmayan örneklerin bir kısmının virüslerle enfekteli olduğu görülürken, şüphe duyulan AMV gibi bazı virüsleri doğrulamak amacıyla yapılan DAS-ELISA ve RT-PCR testlerinde bu virüse rastlanılmamıştır. Ayrıca, test bitkilerindeki farklı virüslerin benzer belirti oluşturduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar, test bitkilerinin mekanik olarak inokulasyonu konusunda yapılan çalışmalarla paralel olarak CMV, SMV, BCMV ve BCMNV için gerçekleştirilmiş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir (Matthews, 1991; Petrović et al., 2010). Biyolojik testler aracılığıyla bazı viral etmenlerin tanınması mümkün iken, zaman tüketimi gibi bazı nedenlerden dolayı klasik yöntemlerin yanı sıra serolojik ve moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla tohum kaynaklı patojenlerin daha kolay ve kesin saptanabildiği belirtilmiştir (Üstün ve ark., 2002).

Yapılan bu çalışmada, DAS-ELISA testinde de negatif sonuç veren bazı örneklerin RT-PCR yöntemi ile pozitif sonuç verdiği görülmüştür. Yapılan diğer bir çalışmada (Kılıç ve ark., 2014), Burdur ili fasulye

yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlardan alınan 102 örneğe DAS-ELISA ve RT-PCR testleri uygulanmıştır. RT-PCR ile 24 örnekte (%23.52) BCMV saptanırken, DAS-ELISA testinde bu oran %17.64 bulunmuş ve PCR yönteminin daha duyarlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Tohum örneklerinin deneme sonuçları baz alınarak yapılan bu karşılaştırmalarda, tanılama yöntemleri arasında RT-PCR yöntemi denemelerde tüm yöntemlerle belirlenen pozitif örneklerin tamamını saptayarak tanılamada % 100 oranında bir başarı sağlamıştır. DAS-ELISA yönteminde % 89.85 oranında başarı sağlanırken, test bitkilerine inokulasyon yönteminde bu oran % 43.47 olarak, tohumda belirtilerin görsel olarak incelenmesinde % 69.56, bitki yetiştirme yöntemi ile % 69.3 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında viral etmenleri tanılamada kullanılan yöntemler arasında moleküler yöntemlerden PCR testleri en güvenilir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Tanılamada kullanılan bu yöntemlerin duyarlılıklarının kıyaslanması ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş ve RT-PCR yöntemi diğer yöntemlere göre daha duyarlı bulunmuştur. Peyambari et al. (2006), BCMV'nün bulunma durumu ile ilgili yaptığı çalışmada DAS-ELISA testinde tohum örneklerinin %75'inin, RT-PCR testinde ise örneklerin %78'inin enfekteli olduğunu belirterek, PCR'in daha duyarlı olduğu sonucuna ulaşmıştır. Bariana et al.(1994) tarafından AMV için ELISA ve PCR yöntemleri kullanılarak iki testin duyarlılığı karşılaştırılmıştır. ELISA testi, 2 ve 20 ng / ml arasındaki konsantrasyonlarda virüsü saptayabilirken, PCR ile tüm konsantrasyonlarda virüsü saptamak mümkün olmuştur.

Bu sonuçlara göre, yürütülen bu çalışma ve diğer araştırmalarda tohumlardaki viral etmenleri tanılamada kullanılan yöntemler arasında Reverse Transcriptase-PCR testlerinin en güvenilir yöntem olduğu görülmektedir. DAS-ELISA testleri de yüksek başarı oranı, çok sayıda örneği aynı anda test edebilme imkanı ve kısa sürede sonuç verme gibi özelliklere sahip tanılama yöntemleri arasında yer almaktadır. Mekanik inokulasyon ve simptomatoloji ise uzun zaman alması ve sonuçların doğruluğunun desteklenme gerekliliği durumu nedeniyle daha az tercih edilmektedir.

Bu çalışmanın tamamlanması ile fasulye tohum örneklerinde bulunan viral etmenlerin tanınmasında yararlanılan yöntemlerin duyarlılıkları konularında bilgiler elde edilmiştir. Fasulye tohumlarında bulunan ve tohumla taşınan etmenlerden BCMV, BCMNV, SMV ve CMV gibi virüslerin çalışmadaki tohum örneklerinde

bulunduğu görülürken, BCMV'nün tohumlarda bulunma oranının azımsanmayacak düzeyde olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, virüsleri tanılamada kullanılan yöntemlerde daha kısa sürede ve doğru sonuç veren yöntemlerin tercih etmenin önemli olduğu göze çarpmıştır.

KAYNAKLAR

- Agarwal, V.K. and J.B. Sinclair. 1988, Principles of Seed Pathology Vols I and II. CRC Press, Boca Raton, Florida, United States, 154 pp.
- Balkaya, A. ve R. Yanmaz. 1999. Karadeniz Bölgesi taze fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) populasyonlarından teksel seleksiyon yoluyla geliştirilen çeşit adayları. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. 14-17 Eylül 1999, Ankara, s. 504-508.
- Bariana, H.S., A.L. Shannon, P.W.G. Chu, and P.M. Waterhouse. 1994, Detection of five seedborne legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test. Phytopathology, 84:1201-1205.
- Cadle-Davidson, M. and M. Jahn. 2005. Resistance conferred against *bean common mosaic virus* by the incompletely dominant I locus of *Phaseolus vulgaris* is active at the single cell level. Archives of Virology, 150: 2601-2608.
- Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34: 475-483.
- De Blas, C., M.J. Borza, M. Saiz and J. Romero. 1994. Broad spectrum detection of *cucumber mosaic virus* (CMV) using the Polymerase Chain Reaction. Journal of Phytopathology 141: 323-329.
- DPV (Descriptions of Plant Viruses). 2012. List of descriptions sorted by name. <http://www.dpvweb.net/dpv/dpvnameidx.php> . (Erişim Tarihi: 27 Mayıs 2012).
- Erkan, S., M. Gümtüş, H. Türküsay ve İ. Duman. 1995. Sanayi Domatesi Çeşitlerine Ait Tohum Örneklerinde Tohum Kaynaklı Bazı Hastalık Etmenlerinin Bulunma Durumunun Saptanması Üzerinde Araştırmalar. Sanayi Domatesi Üretimini Geliştirme Projesi (SANDOM), 7: 47-55.
- Fajardo, T.G., 1930, Studies on the Mosaic Disease of Bean (*Phaseolus vulgaris*). Phytopathology, 20, 469-494.
- Flores-Estévez, N.A., J.A. Acosta-Gallegos and L. Silva-Rosales. 2003, *Bean common mosaic virus* and *Bean common mosaic necrosis virus* in Mexico. Plant Disease, 87:21-25.
- Foissac, X., L. Savalle-Dumas, P. Gentit, M.J. Dulucq and T. Candresse. 2001. Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo and Faveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). Acta Horticulturae, 357: 52-59.
- Güzel, Ö. ve M. Arlı-Sökmen. 2003. Determination of some viruses infecting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their incidences in seed lots in Samsun Province. Journal of Turkish Phytopathology, 32(2): 99-106.
- Hall, R. 1991. Introduction. Pages 1-5 In: Compendium of Bean Diseases, (Ed. R. Hall), APS Press, American Phytopathological Society, V+73 pp.
- Hart, P. 2004. Application of Real Time PCR for Detection and Identification of Soybean Pests in Michigan. Michigan State University, Department of Plant Pathology (Project Number: GR03-004).
- ISTA (International Seed Testing Association). 2012. Seed Testing International, <http://www.seedtest.org/en/seed-testing-international-content--1-1085.html>. (Erişim Tarihi: 10 Ocak 2012).
- Kılıç, H. ve N. Yardımcı. 2014. Burdur ili fasulye üretim alanlarında Fasulye Adi Mozaik Virüsü'nün serolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi 1(2): 289-294.
- Larsen, R.C., P.N. Miklas, K.L. Druffel and S.D. Wyatt. 2005. NL3-K strain is a stable and naturally occurring interspecific recombinant derived from *bean common mosaic necrosis virus* and *bean common mosaic virus*. Phytopathology, 95(9): 1037-1042.
- Martinez-Priego, M., C. Córdoba and C. Jordá. 2004. First Report of *Alfalfa mosaic virus* in *Lavandula officinalis*. Disease Notes, 88(8): 90.
- Matthews, R.E.F. 1991. Plant Virology, 3rd Ed., Acad. Press, New York, 897 pp.
- Nogay, A. 1983. Marmara bölgesi *Cucurbitaceae* Familyası Kültür Bitkilerinde Görülen Virüs Hastalıklarının Tanılanması, Tohumla Geçiş Durumlarının ve Konukçu Dizilerinin Saptanması Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, Erenköy- İstanbul, 120 s.
- Noordam, D. 1973. Identification of Plant Viruses, Methods and Experiments. PUDOC, Wageningen, the Netherlands, 208 pp.
- Önder, M. 2011 Türkiye'de yemeklik tane baklagillerin ekonomik önemi. Tarım Türk Dergisi, 28: 66-68.
- Petrović, D., M. Ignjatov, Z. Nikolić, M. Vujaković, M. Vasić, M. Milošević and T.K. Ajduković. 2010. Occurrence and Distribution of Viruses Infecting the Bean in Serbia. Archive of Biological Science, 62 (3):595-601.
- Peyambari, M., M.K. Habibi, G. Mosahebi and K. Izadpanah. 2006, Determination of seed-born percentages of *bean common mosaic necrosis virus* (BCMV) in three genotypes of *Phaseolus vulgaris*. Commun. Agric. Applied Biological Science., 71(3):1221-1227.
- Provvidenti, R., D. Gonsalves and P. Ranalli. 1982, *Inheritance of resistance to soybean mosaic virus in Phaseolus vulgaris*. Journal of Heredity, 73:302-303.
- Saqib, M., R.A.C. Jones, B. Cayford and M.G.K. Jones. 2000, First report of *Bean common mosaic potyvirus* in Western Australia. New Disease Reports, 10: 43.
- Samuitienė, M. and M. Navalinskienė. 2008. Occurrence of *Cucumber mosaic cucumovirus* on ornamental plants in Lithuania. Zemdirbyste-Agriculture, 95 (3): 135-143.
- Sengooba, T.N., N.J. Spence, D.J. Walkey and A. Femi Lana. 1997, The occurrence of bean common mosaic necrosis virus in wild and forage legumes in Uganda. Plant Pathology, 46: 95-103.
- Spence, N.J. and D.G.A. Walkey. 1995, Variation for pathogenicity among isolates of *bean common mosaic virus* in Africa and a reinterpretation of the genetic relationship between cultivars of *Phaseolus vulgaris* and pathotypes of BCMV. Plant Pathology, 44: 527-546.
- USAID (United States Agency for International Development). 2012. "Food Commodity Fact Sheets", http://www.usaid.gov/ourwork/humanitarian_assistance/ffp/crg/fsbeansnavy (Erişim tarihi: 10 Mayıs 2012).
- Üstün, N., G. Demir ve H. Saygılı. 2002, Tohum Sağlık Testlerinde Son Teknolojik Gelişmeler. Türkiye I. Tohumculuk Kongresi, Bornova-İzmir, Bildiriler Kitabı, s.139-145.
- Zaumeyer, W.J. and R.W. Goth. 1964, A new severe symptom-inducing strain of *bean common mosaic virus*. Phytopathology, 54: 1378-1385.
- Zaumeyer, W.J. and J.P. Meiners. 1975. Disease resistance in beans. Annual Review of Phytopathology, 13: 313-334.